Matevž Srpčič[1]

Regeneracija poškodovanega perifernega živca podgane brez celične podpore distalno od mesta poškodbe[2]

Regeneration of Injured Peripheral Rat Nerve without Cellular Support Distally from the Site of Injury

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: suralni živec – poškodbe, živec regeneracija, Schwannove celice – učinki zdravil, mitomicini, aksoni, podgane

Naš namen je bil preveriti naslednje hipoteze:
1. Začetna hitra elongacija aksonov, ki se po aksonotmezi regenerirajo brez celične podpore, se kasneje upočasni ali celo ustavi.
2. Če dodatno zavremo še proliferacijo Schwannovih celic v proksimalnem krnu, je upočasnitev regeneracije po začetnem obdobju relativne neodvisnosti od celične podpore še bolj izražena.
3. Predhodno kolateralno brstenje, med katerim so aksoni izpostavljeni vplivu NGF, ugodno vpliva na regenerativno sposobnost aksonov, upočasnitev regeneracije med dolgotrajno izgubo celične podpore distalno od poškodbe je manjša ali je celo ni.

Začetna hitra rast senzoričnih aksonov skozi brezcelični odsek se po 8 dneh ustavi. Ustavitvi sledi retrakcija aksonov in zmanjšanje števila aksonov distalno od poškodbe. Kasneje se rast zopet vzpostavi, a je zelo počasna. Aplikacija mitomicina, ki prepreči proliferacijo Schwannovih celic v proksimalnem krnu, začetne hitre rasti huje ne prizadene. Po ustavitvi rasti se aksoni umaknejo do mesta poškodbe, rast se v 6 tednih po poškodbi ne vzpostavi več. Izpostavitev nevronov NGF med predhodnim kolateralnim brstenjem pospeši začetno hitro rast v odsotnosti celične podpore, odloži zastoj rasti in prepreči retrakcijo aksonov. Število aksonov distalno od poškodbe ostane visoko vsaj šest tednov.

Schwannove celice v distalnem krnu regenerirajočim se aksonom zagotavljajo ugodno rastno podlago. Rastni dejavniki iz Schwannovih celic aksonom omogočajo elongacijo in preprečujejo retrakcijo tudi če se rastna podlaga neugodno spremeni. Ob ohranjeni rastni podlagi rastni dejavniki najbrž zmerno pospešijo elongacijo regenerirajočih se senzoričnih aksonov.

ABSTRACT

KEY WORDS: sural nerve – injuries, nerve regeneration, Schwann cells – drug therapy, mitomycins, axons, rats

The following hypotheses were examined:
1. Rapid initial elongation of the regenerating axons in crushed nerves observed even in the absence of distal cell support is later slowed down or stops altogether.
2. If, in addition, Schwann cell proliferation in the proximal nerve stump is prevented, the reduction of the axon elongation rate during the prolonged absence of cell support becomes more severe.

[1] Matevž Srpčič, štud. med., Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

[2] Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1999.

3. Prior collateral sprouting which exposes neurons to higher NGF concentrations has a stimulatory effect on axon regeneration in the absence of cell support, therefore the axon regeneration rate is less affected.

The rapid initial rate of sensory axon growth through acellular distal nerve segments decreases 8 days after axonotmesis. During the next three weeks, retraction of leading axons towards the site of the lesion occurs and the number of axons distal to the crush site is reduced. Axon growth is resumed thereafter, but at a much lower rate. Mitomycin application, which prevents Schwann cell proliferation in the proximal stump, does not prevent the initial rapid axon elongation in the absence of cell support, but later the axons retract all the way to the crush site and no further growth occurs over 6 weeks. Exposure of regenerating axons to NGF during collateral sprouting enhances the initial elongation rate in the absence of cell support, delays cessation of growth and prevents axon retraction. The number of axons distal to the lesion site remains high.

Schwann cells in the distal nerve segment provide and maintain a favourable growth substratum for regenerating axons during a prolonged time period after nerve injury. Growth promoting substances secreted by Schwann cells seem to enable elongation or prevent retraction of axons even in the case of deterioration of the growth substratum. In the presence of good growth substratum, these substances moderately enhance the elongation rate of regenerating sensory axons.

UVOD

Poškodbe perifernih živcev so kljub izpopolnjeni kirurški tehniki še vedno precejšen terapevtski izziv rekonstruktivni kirurgiji. Zdi se, da pomembnejših izboljšav mikrokirurških tehnik danes ni več pričakovati, zato poskušajo napredek v zdravljenju zagotoviti predvsem raziskave fizioloških in patofizioloških dogajanj v perifernem živcu med razvojem, ob poškodbi živca in ob regeneraciji. Poleg kliničnih izkušenj so nepogrešljive raziskave na poskusnih živalih in celičnih kulturah. Dandanes veljata kot glavna problema, ki preprečujeta uspešno regeneracijo perifernega živca po poškodbi, usmerjanje aksonov proti napačnim tarčam in njihova počasna rast *(1)*. Zato se raziskovalci najbolj posvečajo ugotavljanju pomena morebitnih snovi, ki regenerirajoče se aksone usmerjajo (nevro tropne snovi), in snovi, ki spodbujajo njihovo rast (angl. *nerve growth promoting substances*), torej snovem, ki nastajajo v mikrookolju, skozi katerega regenerirajoči se aksoni rastejo.

Poškodba perifernega živca

Poškodb perifernega živca je glede na mehanizem poškodbe in stopnjo okvare več vrst *(1, 2)*. Najlažja poškodba je **lokalni metabolični blok**, pri katerem zaradi kompresije ali draženja živca pride do vnetnega odgovora, spremljajoči edem pa okvari lokalno mikrocirkulacijo. Posledica je lokalen prevodni blok brez strukturnih sprememb aksonov.

Hujša kompresija živca lahko povzroči **nevrapraksijo**, lokalni prevodni blok z različnimi stopnjami demielinizacije, a z ohranitvijo kontinuitete aksonov. Obe poškodbi se relativno hitro pozdravita, saj ne pride do propada aksonov distalno od poškodbe in se aksonom ni treba regenerirati.

Močan stisk živca, pri katerem se aksoni prekinejo, imenujemo **aksonotmeza**. Živec makroskopsko ni prekinjen, nevrilemske cevke iz bazalnih lamin Schwannovih celic tudi ne, aksoni pa distalno od poškodbe propadejo. Ohranjenost nevrilemskih cevk omogoča aksonom, da se regenerirajo vzdolž svojih prejšnjih potekov in reinnervirajo svoje nekdanje tarče. Do napačnega usmerjanja torej ne pride, ta vrsta poškodbe ima zato ugodno napoved.

Povsem drugače pa je pri **nevrotmezi**, popolni prekinitvi živca, kjer so prekinjene tudi nevrilemske cevke. Tu morajo aksoni tudi po najnatančnejši mikrokirurški oskrbi prerasti vrzel med obema krnoma. Pri tem vstopajo v nevrilemske cevke distalnega krna naključno, zato funkcijsko okrevanje ni nikoli popolno, ne količinsko (ne regenerirajo vsi aksoni) ne kakovostno (zaradi napačne usmeritve), pa tudi čas do reinervacije je močno podaljšan.

Spremembe v distalnem krnu

Po prekinitvi aksona se v delu živca distalno od poškodbe (distalni krn) sprožijo značilni procesi, ki jih je sredi prejšnjega stoletja opisal Waller, po njem imenovani Wallerjeva degeneracija. Najprej propadejo aksoni: razpadejo mielinske ovojnice vlaken in aksoplazemski citoskelet *(3)*. Drugi do tretji dan po poškodbi sledi namnožitev celic v distalnem krnu, ki doseže vrhunec štirinajsti dan po poškodbi. Pride do proliferacije Schwannovih celic (SC) in vdora makrofagov iz cirkulacije *(5, 6)*. Število celic se štirikrat poveča, dve tretjini teh celic pa so proliferirajoče SC *(3, 7)*. Obe vrsti celic očistita distalni krn ostankov aksonov in mielina. Namnožene Schwannove celice se v starih ohranjenih cevkah bazalnih lamin razvrstijo v t. i. Büngnerjeve stolpiče, stukture iz starih ohranjenih cevk bazalnih lamin, ki se napolnijo z delečimi se SC. Cevke bazalne lamine in celice v njih so podlaga regenerirajočim se aksonom, ki začnejo vraščati v distalni krn.

Poleg fagocitozne sposobnosti imajo Schwannove celice in omakrofagi tudi pomembno sekrecijsko vlogo. Makrofagom, »poklicnim« fagocitom telesa, so sekretorni pomen začeli pripisovati šele v zadnjem času. Rezultati poskusov kažejo, da vplivajo na proliferacijo Schwannovih celic *(8)*. Izločajo namreč interlevkin 1 (IL-1), ki spodbuja SC k izločanju živčnega rastnega dejavnika (angl. *nerve growth factor,* NGF) *(9, 10)*. Poleg tega izločajo še druge beljakovine, med njimi 37 kD težki apolipoprotein E, ki verjetno sodeluje pri recikliranju lipidov v poškodovanem živcu *(11, 12)*, in trombocitni rastni dejavnik (angl. *platelet-derived growth factor,* PDGF) *(13)*.

Pomen Wallerjeve degeneracije za regeneracijo živcev so raziskovali na posebnem soju miši (C57BL/Ola), pri katerih sta degeneracija distalnega krna in vdor makrofagov po poškodbi izjemno počasna. Pokazala se je pomembna razlika med motoričnimi aksoni, ki so se kljub odsotnosti degeneracije praktično normalno regenerirali, in senzoričnimi aksoni, ki so se v takih razmerah regenerirali zelo počasi *(14, 15)*. Domnevajo, da regeneracijo senzoričnih aksonov pri teh živalih zavira neka komponenta distalnega krna, ki se pri normalnih laboratorijskih živalih med Wallerjevo degeneracijo odstrani, sicer pa je prisotna v normalnem perifernem živcu *(16)*.

Spremembe v proksimalnem krnu in telesu nevrona

Po poškodbi živca v **proksimalnem krnu** retrogradno atrofirajo številni aksoni *(17–19)*, Wallerjeva degeneracija pa zajame tudi majhen odsek prekinjenega aksona proksimalno od poškodbe, vsaj do prvega Ranvierjevega zažemka *(20, 21)*. Nekaj ur po poškodbi se v 2 do 3 mm dolgem odseku proksimalno od poškodbe začne povečevati količina DNA. V prvih 24 urah po poškodbi se število jeder v proksimalnem krnu ne poveča, torej povečanje količine DNA še ne gre na račun vdora celic *(22)*. Temu v 3 do 14 dneh sledi živahna proliferacija celic, ki so v živcu normalno prisotne *(23)* in vdor celic mielomonocitnega izvora, predvsem makrofagov iz krvnega obtoka *(5, 6)*.

Obseg sprememb v telesu nevrona je odvisen od starosti osebka, vrste nevrona, vrste poškodbe in oddaljenosti poškodbe od telesa nevrona *(24, 25)*. Če je poškodba preblizu telesu nevrona, le-ta odmre. Če pa nevron preživi poškodbo, se v celičnem telesu sproži niz funkcionalnih in morfoloških sprememb. Reakcija telesa nevrona omogoči elongacijo aksonov ter morebitno reinervacijo izgubljenih tarčnih tkiv. Telo celice nabrekne, jedro se pomakne na periferijo in Nisslova substanca se razprši. To imenujemo tudi kromatoliza ali tigroliza in je posledica razpada zrnatega endoplazmatskega retikuluma na posamezne poliribosome *(26)*. Omenjene spremembe odsevajo povečano sintetsko aktivnost nevrona, v katerem se začnejo prepisovati geni za mnoge strukturne elemente (npr. tubulin in aktin) in nekatere proteine, povezane z rastjo (angl. *growth associated proteins,* GAP). Najbolj raziskan je GAP-43 *(27, 28)*. Sinteza nevrofilamentov se zmanjša, kar povzroči zmanjšanje premera proksimalnih krnov poškodovanih aksonov *(25)*.

Poskusi, v katerih so s kolhicinom zavrli retrogradni aksonski transport in tako izzvali reakcijo telesa, podobno tisti po poškodbi, nakazujejo, da je prav sprememba v retrogradnem transportu določenih snovi signal, ki sproži omenjene spremembe *(29)*.

Dejavniki v perifernem živcu, ki omogočajo regeneracijo

Regeneracija perifernega živca po poškodbi je, če so razmere ugodne, lahko hitra in uspešna. Za razliko od centralnega živčevja, v katerem se nevroni dolgih živčnih prog po poškodbi ne regenerirajo, je mikrookolje, skozi katerega rastejo aksonski brsti v poškodovanem perifernem živcu, za regeneracijo ugodno *(30, 31)*. Ugodno mikrookolje v perifernem živcu so že dolgo pripisovali predvsem prisotnosti in delovanju Schwannovih celic *(32)*. Danes velja prepričanje, da sta za regeneracijo aksona najpomembnejša dejavnika ustrezna rastna podlaga in različne rast spodbujajoče molekule *(11, 25, 33)*.

Vpliv podlage

Po poškodbi perifernega živca vraščajo regenerirajoči se aksoni v distalni krn tako, da rastejo med Schwannovimi celicami (SC) in notranjo površino nevrilemskih cevk *(34, 35)*. Zato prevladuje mnenje, da rastno podlago regenerirajočim se aksonom v poškodovanem živcu predstavljata notranja površina cevk bazalnih lamin (BL) in plazmalema SC *(36)*. Relativni pomen BL so ugotavljali v poskusih, v katerih so SC iz distalnega krna izločili z zmrzovanjem. V teh poskusih so se aksoni regenerirali v ohranjene nevrilemske cevke brez živih celic. Pokazalo se je, da aksoni razmeroma hitro rastejo skozi notranjost cevk BL, hitrost rasti pa se je zmanjšala le za okrog 30 %. Če so s toplotno obdelavo poleg odstranitve SC še denaturirali beljakovine v BL, se je selektivnost brstov za notranjo površino BL izgubila, hitrost regeneracije pa se je zmanjšala na 10 % normalne vrednosti *(34, 37–39)*.

Selektivnost aksonov za notranjo stran BL so pripisali predvsem lamininu, glikoproteinu, ki je normalna sestavina BL in za katerega so znani receptorji na aksolemi (integrini družine β_1) *(40)*. Če so distalni krn izpostavili protitelesom proti lamininu so tudi ob ohranjeni BL ugotovili izgubo selektivnosti aksonov za notranjost cevk *(38, 39)*. Tudi poskusi *in vitro* s celičnimi kulturami so pokazali afiniteto rastočih aksonov za laminin, pa tudi za fibronektin in še nekatere druge površinske molekule BL in SC *(40–42)*. Laminin ima haptotaktični učinek predvsem kot sestavina BL, kjer je vezan na kolagen tipa IV, saj so *in vitro* ugotovili, da je afiniteta brstov za laminin, če je ta vezan na druge podlage, npr. polilizin, manjša *(43)*.

Fibronektin je molekula, za katero so receptorje (tudi integrini družine β_1) *(33)* našli tako na aksolemi kot na plazmalemi SC, niso pa ugotovili enake selektivnosti za rastoče aksone kot za laminin *(39)*.

Vpliv rast spodbujajočih molekul (trofičnih in tropičnih dejavnikov)

Rastni dejavniki, v angleščini se vse več uporablja izraz *growth promoting molecules,* so snovi, ki na nevron delujejo vzpodbujevalno med razvojem, diferenciacijo in/ali regeneracijo po poškodbi. Znanih je že precej takih molekul, med njimi pa so najbolj raziskani *živčni rastni dejavnik* (angl. *nerve growth factor,* NGF), *možganski nevrotrofni dejavnik* (angl. *brain-derived neurotrophic factor,* BDNF), *insulinu podobni rastni dejavniki* (IGF-1, IGF-2), *trombocitni rastni deja*vnik (angl. *platelet-derived growth factor,* PDGF), *fibroblastni rastni dejavnik* (FGF), *ciliarni nevrotropni dejavnik* (CNTF), *nevrotrofin 4/5* in *levkemijo inhibirajoči dejavnik* (LIF) *(33)*. Znanje o njihovem pomenu med regeneracijo, njihovih učinkih in mehanizmih delovanja je še zelo nepopolno. V grobem lahko njihove možne učinke po poškodbi delimo na tri skupine: izboljšanje preživetja nevronov, spodbujanje regeneracije in indukcija kolateralnega brstenja *(44)*.

Načini, na katere lahko te molekule delujejo, so različni. Po klasični teoriji nevrotrofizma jih kot topne dejavnike izločajo tarčne celice in delujejo na nevrone prek receptorjev na membrani njihovih aksonskih končičev ter nato z retrogradnim transportom pridejo v telo celice. Modelna molekula je **živčni rastni dejavnik (NGF)**. Rita Levi-Montalcini je pokazala, da ima NGF močan spodbujevalni učinek na rast senzoričnih in simpatičnih nevronov v piščančjem embriu *(45–47)*. Receptorje za NGF izražajo med razvojem živčevja na membranah senzorični, simpatični in tudi motorični nevroni, trofični učinek pa je izražen le pri senzoričnih in simpatičnih, na motorične nevrone NGF takega vpliva nima *(48–50)*. Normalno NGF

sintetizirajo in sproščajo tarčna tkiva senzoričnih in simpatičnih aksonov *(51, 52, 54)*. Specifični receptorji na membranah teh nevronov vežejo sproščeni NGF, kompleks NGF-receptor se internalizira in prenese z retrogradnim transportom proti telesu nevrona *(53)*, kjer modificira ekspresijo nekaterih genov in posttranslacijske dogodke *(55, 56)*. Za NGF obstajata na membranah odraslih senzoričnih in simpatičnih nevronov dve vrsti receptorjev: NGF receptor z visoko afiniteto (trkA) in receptor z nizko afiniteto (gp75), ki ni specifičen za NGF, temveč z enako afiniteto veže tudi BDNF in nevrotrofin-3 *(57)*.

Pomen NGF pri regeneraciji senzoričnih aksonov po poškodbi perifernih živcev pa kljub številnim raziskavam ni jasen, saj so si rezultati raziskav pogosto nasprotujoči in jih ni mogoče sestaviti v razvidno sliko. Po poškodbi aksona se dotok NGF iz tarčnih tkiv prekine. V distalnem krnu, kjer poteka Wallerjeva degeneracija, se močno poveča tvorba NGF, ker dva do tri dni po poškodbi makrofagi z izločanjem interlevkina-1 začnejo spodbujati fibroblaste in SC k izločanju NGF *(9, 10)*. Ekspresija obeh vrst receptorjev za NGF na aksolemi poškodovanih nevronov pa se, presenetljivo, močno zmanjša *(58)*. Zato se kljub povečani tvorbi NGF v distalnem krnu med regeneracijo aksonov zmanjša retrogradni transport kompleksa NGF-receptor v telo poškodovanega nevrona *(56)*. Poskusi z dodajanjem eksogenega NGF so pokazali, da tako dodani NGF zmanjša izgubo nevronov po poškodbi *(59, 60)*. Poskusi, v katerih so preprečili učinek endogenega NGF med regeneracijo s protitelesi proti NGF, pa niso pokazali učinka na preživetje nevronov po aksonotmezi in hitrost regeneracije *(61)*. Ne moremo torej izključiti možnosti, da je bil ugodni učinek eksogeno dodanega NGF farmakološki in ne fiziološki, saj so bile koncentracije, dosežene pri dodajanju, od fizioloških mnogo višje.

Poleg NGF kot difuzibilna molekula, za katero obstajajo receptorji na nevronski membrani, deluje tudi **možganski nevrotrofični dejavnik (BDNF)**, ki pomaga pri preživetju in dozorevanju senzoričnih nevronov in poškodovanih motonevronov med razvojem *(62)*. Novejše raziskave kažejo, da se po poškodbi perifernega živca v distalnem krnu poveča tvorba BDNF v Schwannovih celicah *(63)*, v proksimalnem krnu pa se v motonevronih poveča ekspresija za BDNF specifičnih receptorjev (trkB) *(64)*. Na nepoškodovanem odraslem motonevronu trkB receptorjev namreč ni več, izraženi so samo med embriogenezo *(65)*.

Insulinu podobna rastna dejavnika (IGF-1 in IGF-2) sta majhna polipeptida, ki delujeta zelo nespecifično, saj je njun receptor prisoten v skoraj vseh tkivih *(66)*. Pomembna sta med razvojem organizma, v poskusih pa so dokazali, da po poškodbi perifernega živca pospešujeta rast aksonov *(67)* in proliferacijo SC, če te migrirajo v brezcelični distalni krn *(68)*. Aplikacija protiteles proti IGF-1 in/ali IGF-2 močno upočasni regeneracijo aksonov *(67)*.

Levkemijo inhibirajoči dejavnik (angl. *leukemia inhibitory factor,* LIF) je protein, katerega ekspresija se v distalnem krnu po poškodbi živca poveča, poveča pa se tudi njegov retrogradni transport v telo nevrona. Izboljša preživetje motoričnih in senzoričnih nevronov po poškodbi *(69)*.

Kolateralno brstenje

Kolateralno brstenje je izraščanje dodatnih brstov iz nepoškodovanega aksona kot odgovor na delno denervacijo tarčnega tkiva. Ob poškodbi perifernega živca lahko njegovo funkcijo tako delno nadomestijo brsti sosednjih živcev. Opažanje je v kliniki že dolgo znano *(70, 71)*. Opisano je brstenje senzoričnih *(71–74)*, avtonomnih *(75, 76)* in motoričnih nevronov *(77, 78)*.

Kaj sproži kolateralno brstenje? Prevladuje mnenje, da so za sproženje odgovorne spremembe nastajanja nevrotrofičnih dejavnikov v denerviranem tarčnem tkivu *(79, 80)*. Ob poškodbi enega od perifernih živcev se količina NGF v denerviranem področju kože močno poveča *(61, 81)*. Katere celice v denervirani koži pa proizvajajo NGF? To so keratinociti, fibroblasti in Schwannove celice, v katerih so našli mRNA za NGF in NGF sam *(82, 83)*. Povečana količina NGF v denervirani koži po poškodbi perifernega živca je torej lahko posledica zmanjšanega privzema NGF v poškodovane aksone ali pa povečane produkcije NGF zaradi denervacije *(81, 84)*. Poskusi, v katerih so ugotavljali pomen NGF za brstenje aksonov iz sosednjega nepoškodovanega perifernega živca, so pokazali, da se

v prisotnosti protiteles proti NGF kolateralno brstenje senzoričnih aksonov v koži ne inducira, oziroma se, če protitelesa dodamo po začetku brstenja, brstenje ustavi *(61, 85, 86)*. Brstenje senzoričnih aksonov je torej ves čas kritično odvisno od učinkovanja NGF. Ker se v senzoričnih nevronih, katerih aksoni brstijo, poveča tudi ekspresija receptorjev za NGF *(87)*, lahko upravičeno domnevamo, da pride v telesa teh nevronov obilica NGF, mnogo več kot v normalnem senzoričnem nevronu.

V poskusih, ki so potekali na Inštitutu za patološko fiziologijo MF v Ljubljani v zadnjih letih, je bilo ugotovljeno, da predhodno kolateralno brstenje ugodno vpliva na regeneracijo senzoričnih nevronov po poškodbi *(88, 89)*. Predhodno brstenje je pospešilo regeneracijo najhitrejših aksonov in povečalo obseg regeneracije po naknadni poškodbi, a le v primeru, ko so aksoni vraščali v brezcelični distalni odsek. Hitrost regeneracije je bila v tem primeru enaka kot pri aksonih, ki niso predhodno brsteli, so pa imeli celično podporo distalno od mesta poškodbe. Nasprotno pa predhodno brstenje ni pospešilo regeneracije, če je bila celična podpora v distalnem krnu ohranjena, se je pa povečal obseg regeneracije *(88)*.

Namen in hipoteza naloge

Poškodbi perifernega živca sledi značilen odziv Schwannovih celic v distalnem krnu. Mnenja o pomenu celične podpore distalno od poškodbe za uspešno regeneracijo senzoričnih aksonov se v zadnjem času spreminjajo, še vedno pa obstajata dve pomembni vprašanji, na kateri nimamo zadovoljivih odgovorov.

Prvič, kakšen je *pomen povečane tvorbe različnih rast spodbujajočih snovi v SC* distalnega krna po poškodbi? Rezultati raziskav, predvsem glede pomena NGF pri regeneraciji poškodovanih senzoričnih aksonov, so si nasprotujoči, kar smo že opisali.

Drugič, zanima nas, kakšen je *pomen same podlage, po kateri regenerirajoči se aksoni rastejo*. Ali so cevke BL, ki jih tvorijo SC, po poškodbi in odstranitvi živih SC iz distalnega krna z zmrzovanjem dovolj za uspešno regeneracijo aksonov? Rezultati poskusov na našem inštitutu so pokazali, da lahko regenerirajoči se senzorični aksoni po aksonotmezi rastejo v nevrilemske cevke tudi v odsotnosti živih SC v prvih osmih dneh po poškodbi in to dokaj hitro, saj se je hitrost regeneracije zmanjšala le za okrog 30 % *(37, 90)*. Poleg tega so ugotovili, da regenerirajoči se aksoni lahko prerastejo 2–3 cm dolg brezcelični odsek živca in popolnoma obnovijo bolečinsko občutljivost kože, čeprav z manjšo zamudo *(91)*.

V poskusih, pri katerih so kot model poskusne poškodbe uporabili nevrotmezo, torej popolno prekinitev živca, pa je bila regeneracija brez celične podpore distalno od poškodbe dosti slabša. Ugotovili so, da začnejo aksoni rasti v presajeni odsek perifernega živca precej kasneje kot v kontrolni presadek z ohranjenim celicami in da je njihova rast skozi brezcelični presadek dosti počasnejša *(92, 93)*. Poročajo tudi, da aksone pri regeneraciji skozi brezcelični presadek spremljajo SC *(92, 93)*. Še več, v primeru, ko so zavrli proliferacijo SC v proksimalnem krnu, aksoni v obdobju prvih petih tednov po poškodbi praktično niso vraščali v brezcelični presadek *(94)*.

Naštete razlike med rezultati omenjenih poskusov lahko do neke mere pripišemo različnim poskusnim razmeram. Zdi se, da je vzrok zamude v začetku regeneracije pri rasti regenererirajočih se aksonov v distalni krn v primeru nevrotmeze prav premostitev vrzeli med krnoma, za kar so očitno nujne vitalne SC. **Predpostavili smo, da je čas, v katerem so regenerirajoči se aksoni prikrajšani za podporo živih SC, pomemben za nadaljnji uspeh regeneracije.** Zato se nam je zdelo pomembno proučiti, kakšna je regeneracija senzoričnih aksonov skozi dolg, popolnoma brezcelični segment med daljšim časovnim obdobjem in ali je na to dogajanje mogoče vplivati s spreminjanjem izpostavljenosti poškodovanih nevronov trofičnim dejavnikom.

Postavili smo naslednje hipoteze:

1. Po kratkem začetnem obdobju dokaj hitre rasti, ko so regenerirajoči se senzorični aksoni relativno odporni proti pomanjkanju celične podpore v distalnem krnu, se kasneje hitrost elongacije aksonov upočasni ali celo ustavi.

2. Če poleg uničenja celic v distalnem segmentu dodatno zavremo proliferacijo Schwannovih celic v proksimalnem krnu, je upočasnitev regeneracije po začetnem obdobju relativne odvisnosti od celične podpore še bolj izražena.
3. Predhodno kolateralno brstenje, ki nevrone izpostavi povečanim količinam rast spodbujajočih dejavnikov (predvsem NGF) *(61)*, na regenerativno sposobnost aksonov vpliva pozitivno, upočasnitev regeneracije med dolgotrajno izgubo celične podpore v distalnem krnu je manjša ali je celo ni.

MATERIALI IN METODE

Operativni postopki

Živali in anestezija

Poskusi so potekali v laboratorijih Inštituta za patološko fiziologijo MF Univerze v Ljubljani, ki ima dovoljenje Ministrstva za kmetijstvo za delo s poskusnimi živalmi (št. odločbe 326–07–26/98).

Vse poskuse smo izvajali na samcih belih laboratorijskih podgan soja Wistar. Živali so ob prvi operaciji tehtale od 180 do 260 gramov. Kot anestetik smo pri operacijah uporabili mešanico dihidrotiazina (Rompun, Bayer, Leverkusen, Nemčija, 5 mg/kg) in ketamin-hidroklorida (Ketanest, Parke – Davis GMBH, Berlin, Nemčija, 90 mg/kg), ki smo jo vbrizgali intraperitonealno. Pri testu uščipa živca je bila potrebna plitvejša anestezija, ki smo jo dosegli s pentobarbitalom (Vetanarcol, Veterinaria AG, Zürich, Švica, 20 mg/kg i. p.).

Kirurški posegi

Živali smo razvrstili v štiri poskusne in dve kontrolni skupini:

Poskusna skupina A – REGENERACIJA SKOZI BREZCELIČNI ODSEK
Živalim smo v globoki anesteziji s standardnim pristopom skozi kožo, mišice in fascije stegna in goleni izpostavili področje podkolenske jame *(fossa poplitea)*.

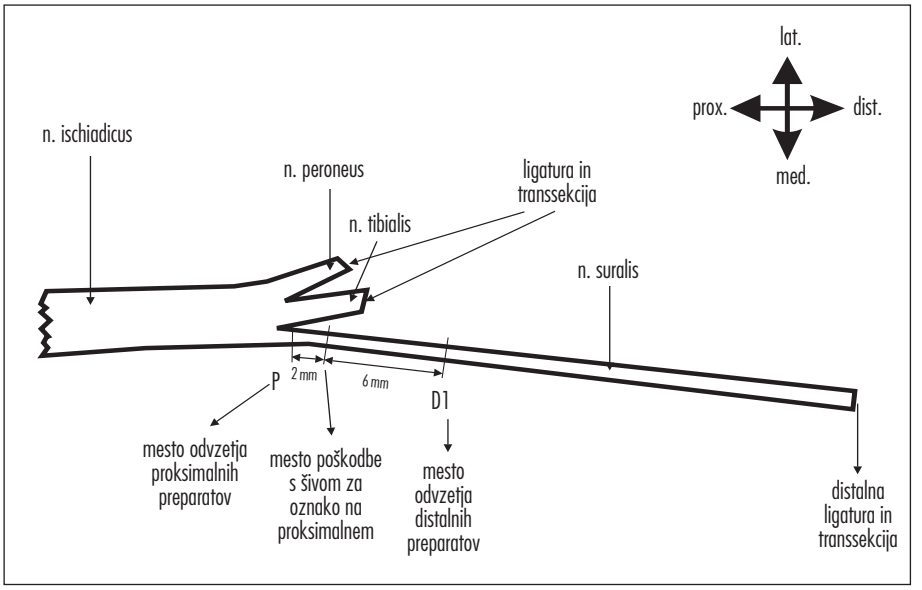
Približno 1 cm distalno od odcepišča *n. suralisa* od *n. ischiadicusa* smo drugi dve končni veji *n. ischiadicusa* (*n. tibialis* in *n. peroneus*) ligirali in prerezali, da bi bile poskusne razmere čim bolj podobne tistim v skupini B. Prerezali smo tudi medialno in lateralno kožno vejo, *n. cutaneus surae medialis* in *lateralis*.

N. suralis smo nato ločili od veziva in spremljajočih žil čim bolj distalno v njegovem poteku v goleni. Distalno smo ga ligirali in prerezali, potem pa približno 3 mm od odcepa od *n. ischiadicusa* napravili aksonotmezo. Živec smo 30 sek. stiskali z 2 mm širokim šivalnikom z gladkima prijemalnima ploskvama, nato pa proksimalni rob poškodbe označili s tankim šivom skozi epinevrij. Živec smo podložili z gumijasto ploščico za zaščito okolnega tkiva in ga s suhim ledom (CO_2, T = –40 °C) zmrzovali, ga potem odtajali s fiziološko raztopino sobne temperature in postopek ponovili še dvakrat, tako, da je zmrzovanje in odtajanje trajalo približno 3 minute.

N. suralis smo reponirali v njegov normalni potek, konec distalne ligature pa s šivom fiksirali v mišico *triceps surae*. Rano v mišicah na stegnu smo zašili, kožo speli s sponkami in pustili žival okrevati. Operirali smo v čistih, ne pa sterilnih razmerah. V skupini je bilo 91 živali.

Poskusna skupina B – REGENERACIJA SKOZI BREZCELIČNI ODSEK PO PREDHODNEM BRSTENJU
Pri tej skupini sta bili potrebni dve ločeni operaciji. Pri prvi smo, da bi vzpodbudili kolateralno brstenje *n. suralisa*, po standardnem pristopu v podkolensko jamo izpreparirali *n. peroneus* in *n. tibialis*, ju ligirali in prerezali, prerezali pa smo tudi oba kožna živca. *N. suralis* smo pustili nedotaknjen in se sploh trudili, da bi bili rana in poškodba v podkolenski jami minimalni. Rano smo zašili, kožo speli s sponkami. Nato smo prikazali še *n. saphenus*, ki poteka po medialni strani stegna tik pod kožo. Ločili smo ga od spremljajoče žile, ga proksimalno ligirali in prerezali, nato pa odstranili še približno 1 cm živca v njegovem distalnem poteku. Rano v koži smo speli s sponkami.

Žival smo pustili okrevati 14 dni in jo potem drugič operirali. Ta postopek je bil popolnoma enak kot pri skupini A, izpostavili smo *n. suralis*, ga 3 mm distalno od odcepa od *n. ischiadicusa* pretisnili s šivalnikom in nato zmrzovali s suhim ledom distalno od poškodbe. V skupini je bilo 39 živali.



Slika 1. *Skica živca in mest odvzema vzorcev za histološko analizo.*

Poskusna skupina C – REGENERACIJA SKOZI BREZCELIČNI ODSEK PO APLIKACIJI CITOSTATIKA V MESTO AKSONOTMEZE
Postopek je bil pri tej skupini enak kot pri skupini A, razen, da smo po poškodbi in zmrzovanju *n. suralisa* na mesto poškodbe z mikroinjekcijo (28 g) vbrizgali 5 ml citostatika mitomicina (Mutamycin, raztopina 400 µg/ml, Bristol Caribbean Inc., Mayaguez, Portoriko) *(94)*. Raztopino smo vbrizgali pod epinevrij n. suralisa in v vezivo med *n. suralisom* in *n. tibialisom*. Pri tem smo zelo pazili, da mikroinjekcija ni poškodovala suralisovih vlaken, da pa smo raztopino vbrizgali v vezivo v neposredni bližini aksonotmeze *n. suralisa*. V skupini je bilo 24 živali.

Kontrolna skupina K1: REGENERACIJA PO AKSONOTMEZI
V prvi kontrolni skupini smo živali operirali na enak način kot v poskusni skupini N, le da živca nismo zmrzovali, smo ga pa za 3 minute pustili na gumijasti ploščici za zaščito tkiva in ga spirali s fiziološko raztopino. V skupini so bile 4 živali.

Kontrolna skupina K2: NORMALNI NEPOŠKODOVANI ŽIVEC
V drugi kontrolni skupini so bile 4 neoperirane živali.

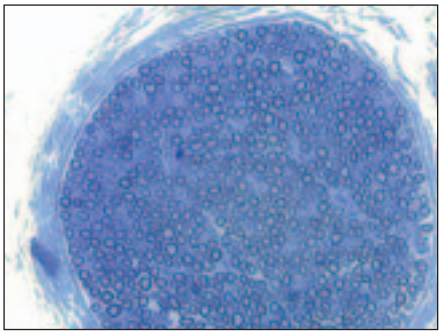
Testiranja, meritve in štetje

Test uščipa živca

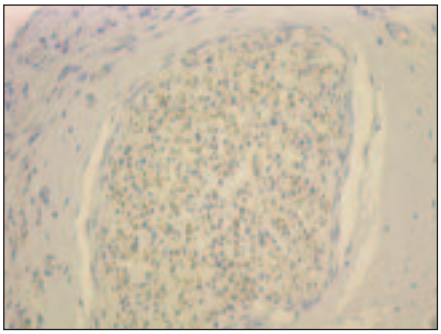
Razdaljo, ki so jo najhitrejši regenerirajoči se senzorični aksoni dosegli v določenem času, smo ugotavljali s testom vščipa živca *(pinch test, (93, 37))*. V plitvi barbituratni anesteziji smo *n. suralis* izpostavili in ločili od veziva, nato pa smo ga s tanko pinceto rahlo ščipali. Začeli smo na distalnem koncu in z milimetrskimi koraki nadaljevali v proksimalni smeri proti označenemu mestu aksonotmeze. Mesto na živcu, kjer smo ob vščipu prvič zaznali odgovor (refleksna skrčitev mišic na stegnu in v dimljah), smo označili s šivom. Žival smo žrtvovali. Potem smo prerezali *n. ischiadicus* visoko v stegnu, ga položili na ravnilo in izmerili razdaljo na *n. suralisu* med mestom aksonotmeze in mestom pozitivnega vščipnega testa.

Štetje aksonov

HISTOLOŠKI PRIKAZ MIELINIZIRANIH AKSONOV V PROKSIMALNEM KRNU
Po testu vščipa živca smo izolirani odsek živca prečno prerezali z britvico 2 mm proksimalno od šiva, ki je označeval poškodbo (točka P, slika 1), in 6 mm distalno od tega šiva (točka



Slika 2. *Normalni suralni živec (prečni rez). Prikaz barvanja mielinskih ovojnic aksonov. Mielinizirani aksoni so vidni kot modro obarvani obročki.*



Slika 3. *N. suralis, ki je predhodno kolateralno brstel, po 14 dneh regeneracije skozi brezcelični odsek (prečni rez skozi distalni krn). Prikaz imunihistokemične reakcije na nevrofilament v aksonih. Nevrofilamente vsebujoči aksoni so vidni kot rjave pege.*

D1, slika 1). Kratek del živca proksimalno od točke P in del distalno od točke D1 smo potopili v fiksativ (2 % glutaraldehid in 2 % paraformaldehid v veronal-acetatnem pufru, pH 7,4) za 12 ur. Fiksaciji je sledilo: spiranje v veronal-acetatnem pufru, dehidracija skozi alkohole naraščajočih koncentracij in vklapljanje v Epon. Po dveh dneh sušenja eponske smole smo vzorce prečno narezali na poltanke rezine in jih obarvali z barvilom Azur II. Mielinizirani aksoni se na preparatu pokažejo kot modro obarvani obročki. Te smo nato prešteli na celotnem preseku živca.

IMUNOHISTOKEMIČNI PRIKAZ NEVROFILAMENT VSEBUJOČIH AKSONOV V DISTALNEM KRNU

Drugi del izoliranega živca, odsek med točkama P in D1, smo fiksirali v pufranem paraformaldehidu (pH 7,4) 24 ur, ga dehidrirali v alkoholni vrsti naraščajočih koncentracij in ga vklopili v parafin. Na proksimalnem in distalnem koncu (torej spet na točkah P in D1) smo narezali prečne rezine debeline 2–5 µm. Za imunohistokemično označevanje nevrofilamentov v rezinah smo uporabili aparat za avtomatično imunohistokemično analizo TECHMATE 500. Uporabili smo metodo LSAB (streptavidin-biotinska metoda označevanja). Antigene smo demarkirali z mikrovalovno predobdelavo (dvakrat po 5 minut) v citratnem pufru. Nato smo pri sobni temperaturi nanesli primarno protitelo NFMoAB (klon 2F11)-DAKO (Glostrup, Danska). Vsi uporabljeni reagenti so predpisani za uporabo aparata za avtomatično imunohistokemično barvanje TECHMATE 500 in so proizvod firme DAKO, Danska.

ANALIZA ŠTEVILA AKSONOV

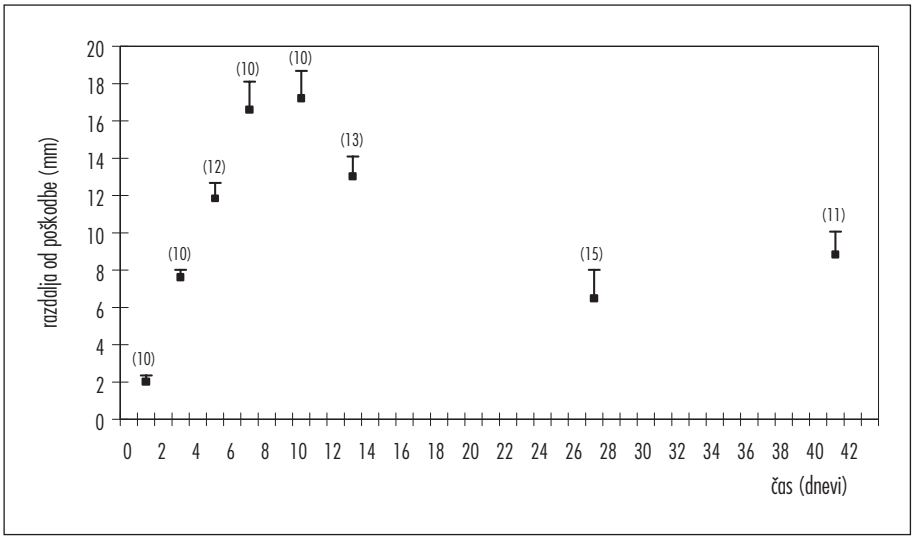
Število mieliniziranih vlaken in NF-pozitivnih profilov v preparatih prečnih rezov smo določali s pomočjo računalniškega sistema za analizo slike s programom The microcomputer imaging device (MCID) – verzija 2.0. Sistem sestavljajo: svetlobni mikroskop, videokamera, pretvornik za digitalizacijo slike, monitor, osebni računalnik IBM PC AT in miška.

Z objektivom s 40-kratno povečavo smo na izbranih rezih videli mielinizirane aksone kot modro obarvane obročke (slika 2), NF-vsebujoče strukture pa kot rjave pege (slika 3). Z miško smo s kazalcem na zaslonu označili pozitivne strukture, nato pa jih je program preštel.

Statistične metode

Za analizo razlik med dvema vzorcema smo uporabljali Studentov t-test z Bonferronijevim popravkom. Skupine podatkov v poskusni skupini A smo analizirali s statističnim testom za analizo variance. Hitrost regeneracije v skupini A smo določili s formulo za izračun naklona regresijske premice *(94)*.

Pri delu smo uporabljali računalniški program Statist, razvit na Inštitutu za patološko fiziologijo, Ljubljana, in Microsoftov program Excel 97.



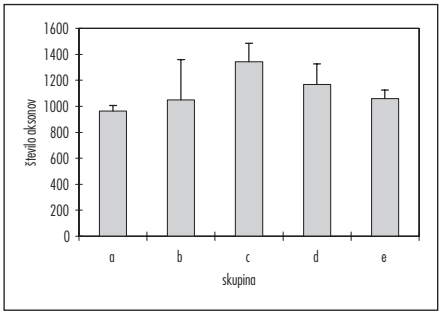
Slika 4. *Razdalje, ki so jih dosegli najhitrejši regenerirajoči se aksoni po aksonotmezi in zmrzovanju/odtajanju živca distalno od poškodbe (skupina A), izmerjene s testom uščipa živca.*
Prikazane so srednje vrednosti, standardni odkloni in v oklepajih število živali v posameznih vzorcih.

REZULTATI

Elongacija senzoričnih aksonov po poškodbi: regeneracija skozi brezcelični odsek

Kot smo ugotovili s testom vščipa živca, so v poskusni skupini A (slika 1) aksoni rasli skozi brezcelični odsek *n. suralisa* distalno od poškodbe do 8. dneva po poškodbi s stalno hitrostjo (naklon regresijske premice 2,4 mm/dan). Med 8. in 11. dnem se je elongacija skoraj ustavila. Med 11. in 14. dnem se je razdalja od mesta aksonotmeze, na kateri je bilo s testom vščipa še moč dokazati aksone, že občutno zmanjšala. Razlika v razdaljah med 11. in 14. dnem je bila statistično značilna ($p < 0{,}001$). Med 14. in 28. dnem po poškodbi je bilo zmanjšanje razdalje, ki so jo dosegli senzorični aksoni, najbolj izrazito, povprečna razdalja po 28 dneh je bila od največje, izmerjene 11. dan po poškodbi, krajša za skoraj 11 mm. Tudi ta razlika je bila statistično značilna ($p < 0{,}001$). V obdobju med 28. in 42. dnem pa smo ugotovili spet majhno, a statistično značilno podaljšanje aksonov ($p < 0{,}01$).

Dosežene razdalje od 11. do 42. dneva smo analizirali s statističnim testom za analizo variance. Skupine smo nato med seboj primerjali s Studentovim t-testom, pri čemer smo upoštevali Bonferronijev popravek.



Slika 5. *Povprečno število mieliniziranih aksonov, prikazanih z barvanjem mielinske ovojnice, v n. suralisu 3 mm proksimalno od poškodbe. Skupine:*
a – n. suralis 14 dni po aksonotmezi, brezcelični distalni krn;
b – n. suralis 28 dni po aksonotmezi, brezcelični distalni krn;
c – n. suralis 42 dni po aksonotmezi, brezcelični distalni krn;
d – n. suralis 28 dni po aksonotmezi, ohranjena celična podpora v distalnem krnu;
e – normalni n. suralis.
Prikazane so srednje vrednosti in standardni odkloni (n = 4).

Število mieliniziranih aksonov proksimalno od poškodbe

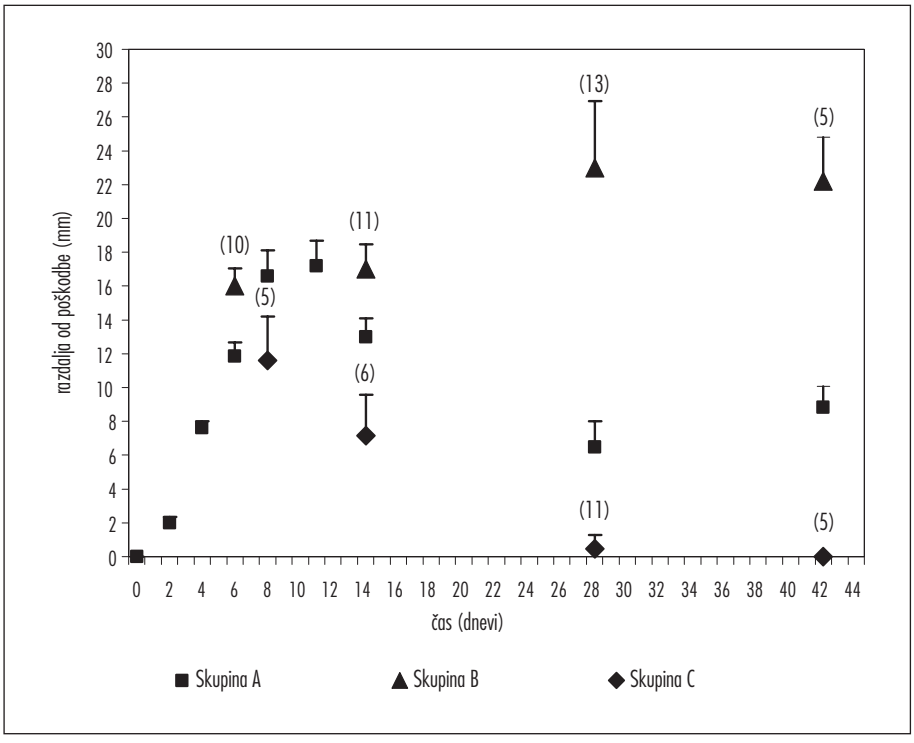
V poskusni skupini A smo po barvanju mielinskih ovojnic prešteli mielinizirane aksone

v prečnih rezinah *n. suralisa*, odvzetih 3 mm proksimalno od poškodbe (slika 2). Ugotovili smo, da se število aksonov v *n. suralisu* po 14, 28 in 42 dneh rasti skozi brezcelični distalni odsek ni statistično značilno razlikovalo od števila aksonov v poškodovanem živcu, katerega aksoni so se 28 dni regenerirali skozi distalni krn z ohranjeno celično podporo ($p > 0,05$ za vse pare). V nobenem živcu nismo videli delno razgrajenih mielinskih ovojnic, ki so značilne za propadle aksone. Tudi med številom aksonov v nepoškodovanem *n. suralisu* in številom aksonov v poškodovanem živcu, katerega aksoni so se 4 tedne regenerirali skozi distalni krn z ohranjeno celično podporo, ni bilo statistično pomembne razlike ($p > 0,05$).

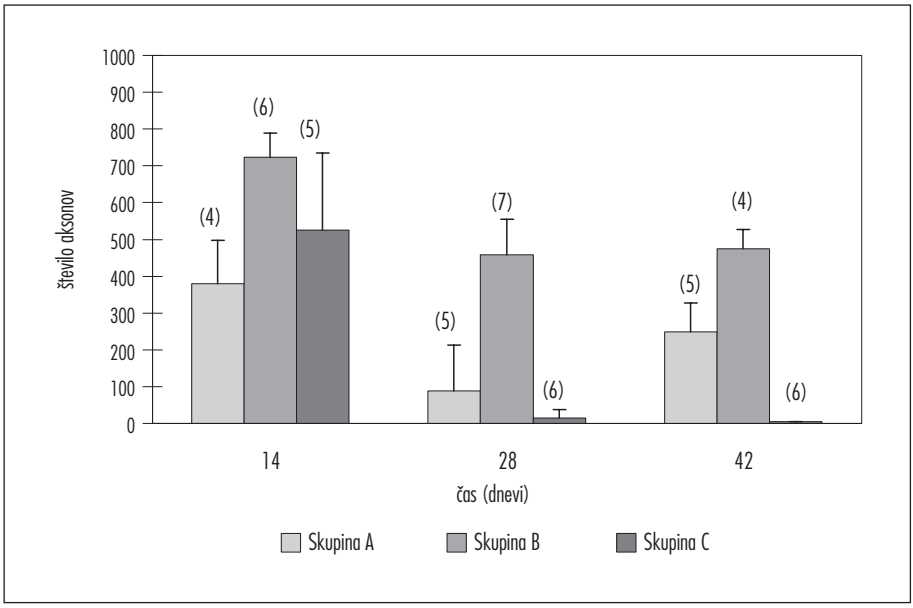
Vse skupine vzorcev smo med seboj primerjali s Studentovim t-testom, pri čemer smo. upoštevali Bonferronijev popravek

Elongacija senzoričnih aksonov po poškodbi: regeneracija skozi brezcelični odsek po predhodnem kolateralnem brstenju ter po aplikaciji mitomicina v proksimalni krn

V poskusni skupini B, kjer so se aksoni regenerirali skozi brezcelični odsek *n. suralisa* po predhodnem kolateralnem brstenju, smo s testom uščipa živca merili največjo razdaljo, ki so jo dosegli regenerirajoči se aksoni, prvič 6 dni po poškodbi (slika 4). Aksoni so tedaj povprečno dosegli večjo razdaljo od mesta aksonotmeze ($16 \pm 1,0$ mm) kot v skupini A ($12 \pm 0,8$ mm). Razlika je statistično značilna ($p < 0,01$). Tudi 14 dni po poškodbi je bila razdalja v skupini B statistično značilno večja kot v skupini A. V nasprotju s skupino A po 28 dneh nismo ugotovili zmanjšanja največje dosežene razdalje. Razdalja od mesta aksonotmeze, ki so jo povprečno dosegli aksoni



Slika 6. *Razdalje, ki so jih dosegli najhitrejši regenerirajoči se aksoni po aksonotmezi in zmrzovanju/odtajanju živca, izmerjene s testom uščipa živca. Učinek predhodnega brstenja (skupina B) ali aplikacije mitomicina v proksimalni krn ob poškodbi (skupina C). Za primerjavo so vrisani tudi podatki za poskusno skupino A.*
Prikazane so srednje vrednosti, standardni odkloni in v oklepajih število živali v posameznih vzorcih. (Število živali za vzorce skupine A zaradi preglednosti slike ni podano in je navedeno v sliki 3).



Slika 7. *Število aksonov (nevrofilament vsebujočih profilov) 6 mm distalno od poškodbe po 14, 28 oziroma 42 dneh. Prikazane so srednje vrednosti, standardni odkloni in v oklepajih število živali v posameznih vzorcih.*

v skupini B, je bila 23 ± 3,9 mm in je bila statistično značilno večja kot razdalja po 6 dneh ($p < 0,01$) v tej skupini in značilno večja od razdalje, na kateri je bilo mogoče dokazati aksone po 28 dneh v skupini A ($p < 0,01$). Aksoni so torej pri živalih v skupini B skozi brezcelični odsek rasli tudi v tretjem in četrtem tednu po poškodbi, ne pa več med četrtim in šestim tednom po poškodbi. Povprečna razdalja 42. dan je bila pri skupini B 22 ± 2,6 mm, kar je sicer statistično značilno več kot v skupini A po 42 dneh ($p < 0,01$).

V poskusni skupini C, kjer smo ob aksonotmezi z mitomicinom zavrli proliferacijo SC v proksimalnem krnu, so bili rezultati povsem drugačni (slika 6). Osmi dan po poškodbi so aksoni od mesta poškodbe dosegli povprečno razdaljo 12 ± 1,6 mm, do 14. dneva se je dosežena razdalja že statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala na povprečno 7 ± 2,4 mm. Obe razdalji sta statistično značilno manjši od razdalj, doseženih pri ustreznih časih v skupini A ($p < 0,01$). 28. dan po poškodbi smo zaznali odziv na vščip *n. suralisa* distalno od poškodbe samo pri treh živalih, pa še to največ 2 mm od poškodbe, pri osmih živalih pa odziva distalno od poškodbe ni bilo. Proksimalno od poškodbe je bil test uščipa pozitiven. Povprečna razdalja, ki so jo dosegli aksoni, je bila statistično značilno manjša kot v skupini A po 28 dneh ($p < 0,01$). 42. dan po aksonotmezi nismo s testom uščipa distalno od poškodbe zaznali odziva pri nobeni živali, proksimalno od poškodbe pa je bil test pri vseh pozitiven. (slika 2)

Razlike med skupinami smo ocenjevali s Studentovim t-testom, pri čemer smo upoštevali Bonferronijev popravek.

Obseg regeneracije aksonov

Rezultati analize, pri kateri smo šteli tiste točkaste strukture na prečnem prerezu brezceličnega distalnega segmenta poškodovanega *n. suralisa*, ki so kazale imunohistokemično reakcijo na nevrofilament, so prikazani na sliki 7. V skupini A smo 14 dni po poškodbi 6 mm distalno od poškodbe našteli povprečno 380 ± 117 aksonov (NF pozitivnih profilov). Po 28 dneh smo aksone opazili le še v dveh vzorcih živcev od petih, v ostalih treh aksonov nismo videli. Po 42 dneh je bilo aksonov povprečno 249. Razlika med številom aksonov po 14 dneh in 28 dneh je statistično značilna ($p < 0,01$), razlika med številom po 28 in 42 dneh pa ne ($p > 0,05$).

V skupini B, kjer so aksoni *n. suralisa* predhodno brsteli, je bilo aksonov v brezcelič nem

odseku živca več kot v skupini A v vseh časovnih obdobjih. Vse razlike med skupinama so bile statistično značilne ($p < 0,01$). Največ aksonov smo v skupini B našteli 14. dan po poškodbi (povprečno 723 ± 65), v 4. in 6. tednu pa je njihovo število upadlo za okoli 40 % in se pri obeh časih ni razlikovalo. Razlika med številom aksonov po 14 in 28 dneh v skupini B je bila statistično značilna ($p < 0,01$).

V skupini C, kjer smo v proksimalni krn poškodovanega *n. suralisa* vbrizgali mitomicin, se število aksonov v brezceličnem distalnem krnu 14. dan po poškodbi ni statistično značilno razlikovalo od ustreznega števila v skupini A ($p > 0,05$). 28 dni po poškodbi je bilo aksonov v skupini C statistično značilno manj kot po 14 dneh ($p < 0,01$), 42 dni po poškodbi pa aksonov 6 mm distalno od poškodbe v skupini C nismo našli.

Vse razlike med vzorci smo med seboj primerjali s Studentovim t-testom, pri čemer smo uporabili Bonferronijev popravek.

RAZPRAVA

Z zmrzovanjem dolgega odseka suralnega živca distalno od mesta aksonotmeze prav do mesta, kjer smo živec najbolj distalno prerezali in zašili na mišico, smo uničili vse celice v tem odseku. S tem smo odstranili celično podporo regenerirajočim se aksonom in distalni vir SC, ohranjena pa je ostala kontinuiteta bazalnih lamin nevrilemskih cevk. Rezultati testa uščipa živca v poskusni skupini A (regeneracija skozi brezcelični odsek) so potrdili našo prvo hipotezo, da se po začetnem obdobju dokaj hitre rasti aksonov skozi brezcelični segment, torej brez celične podpore distalno od poškodbe, regeneracija upočasni. Hitrost rasti v prvih osmih dneh po poškodbi v našem poskusu se ujema z rezultati prejšnjih poskusov *(37, 88)* in je približno za 30 % manjša kot hitrost rasti senzoričnih aksonov v nezmrzovanih živcih (ob ohranjeni celični podpori v distalnem krnu), poškodovanih le z aksonotmezo *(37, 88)*. Temu obdobju sorazmerne »odpornosti« proti pomanjkanju živih celic v distalnem krnu v našem poskusu v drugem tednu sledi zastoj elongacije regenerirajočih se aksonov. V tretjem in četrtem tednu pa se je razdalja od mesta aksonotmeze do točke, na kateri je bilo s testom uščipa še mogoče zaznati aksone, skrajšala z okrog 18 mm na povprečno 7 mm. Tudi število regenerirajočih se aksonov 6 mm distalno od mesta aksonotmeze se je statistično značilno zmanjšalo. Oboje bi bilo lahko posledica bodisi propada celih nevronov, katerih aksoni so v začetni fazi regeneracije dosegli največje razdalje, ali pa umika (skrajšanja, retrakcije) teh aksonov na krajšo dolžino, ki jo v danih razmerah nevroni še lahko vzdržujejo. Da bi ugotovili, kateri mehanizem je vpleten pri opaženem pojavu, smo prešteli mielinizirane aksone 3 mm proksimalno od poškodbe v poskusni skupini A in jih primerjali s številom aksonov v kontrolnih suralnih živcih na ustreznih mestih (v živcih, pri katerih po aksonotmezi distalnega odseka nismo zmrzovali in so se aksoni regenerirali ob ohranjeni celični podpori ter v nepoškodovanem *n. suralisu*). Če bi namreč prišlo do propada celih nevronov, bi se to moralo pokazati kot zmanjšanje števila aksonov proksimalno od poškodbe v obdobju med 2. in 4. tednom po poškodbi. Število mieliniziranih aksonov proksimalno od poškodbe v poskusni skupini A ni bilo statistično značilno manjše od števila aksonov v normalnem nepoškodovanem *n. suralisu*, pa tudi ne od števila aksonov v *n. suralisu*, katerega aksoni so se regenerirali skozi distalni krn z ohranjeno celično podporo. Skrajšanje razdalje med mestom aksonotmeze in točko pozitivnega testa uščipa med 2. in 4. tednom regeneracije skozi brezcelični odsek je torej posledica skrajšanja (retrakcije) regenerirajočih se senzoričnih aksonov, ne pa propada celotnih nevronov, katerih aksoni so se regenerirali brez celične podpore.

V nadaljevanju regeneracije v petem in šestem tednu po poškodbi smo opazili ponovno podaljševanje aksonov, ki pa je bilo dosti počasnejše kot v prvi fazi regeneracije, saj se je njihova povprečna dolžina v 2 tednih povečala le za 2–3 mm.

Iz opaženega lahko sklepamo, da je regeneracija senzoričnih aksonov brez celične podpore v distalnem krnu po aksonotmezi večfazna. Prvi fazi, v kateri regenerirajoči se aksoni rastejo relativno hitro brez podpore živih celic, sledi v drugem tednu po poškodbi faza zastoja rasti, nato pa faza retrakcije regenerirajočih se aksonov proti mestu poš-

kodbe. Domnevamo, da postane v teh dveh fazah rast aksonov popolnoma odvisna od celične podpore. V zadnji fazi se rast aksonov obnovi, vendar je hitrost elongacije zelo majhna.

Razlogi za zaustavitev elongacije aksonov v drugi fazi

Zdi se, da je rast senzoričnih aksonov v začetni fazi od celične podpore razmeroma neodvisna, da pa jo SC zmerno pospešujejo *(37)*. Kaj se torej spremeni po prvem tednu, da se regeneracija senzoričnih aksonov ustavi? Ena možnost je, da *se zmanjša sposobnost samih senzoričnih nevronov, da bi vzdrževali elongacijo svojih aksonov skozi brezcelični odsek*, druga pa, da *se rastna podlaga, po kateri se aksoni regenerirajo, s časom tako spremeni, da aksonom več ne omogoča rasti.*

Na Inštitutu za patološko fiziologijo MF so vzporedno z našimi potekali poskusi, ki naj bi pojasnili, katera od obeh možnosti za ustavitev regeneracije je bolj verjetna. Ugotovili so, da so aksoni, ki so najprej en teden po aksonotmezi rasli v brezcelični odsek, v drugem tednu regeneracije rasli z enako hitrostjo kot prvi teden, če so jim zagotovili nespremenjeno rastno podlago v brezceličnem krnu. To so dosegli tako, da so *n. suralis* podgane poškodovali z aksonotmezo, njegove aksone pustili en teden regenerirati skozi brezcelični distalni krn. Potem so po testu uščipa isti živec še enkrat poškodovali z aksonotmezo približno 20 mm proksimalno od prve poškodbe, ga distalno od te druge poškodbe zopet zmrzovali in opazovali regeneracijo. Razdalje, ki so jih aksoni dosegli drugi teden regeneracije, so bile v tem primeru enake kot v prvem tednu. To pomeni, da do ustavitve regeneracije v drugem tednu ne pride, če regenerirajočim se aksonom zagotovimo enako rastno podlago, kot je tista prvi teden po poškodbi *(Bajrović 1998, neobjavljeni podatki, osebna komunikacija)*.

Zato domnevamo, da ustavitev rasti aksonov po obdobju hitre rasti ni posledica zmanjšane rastne kapacitete regenerirajočih se aksonov, temveč da je vzrok za ustavitev regeneracije po aksonotmezi ob dolgotrajni odsotnosti celične podpore v distalnem krnu degeneracija rastne podlage.

V prvi fazi rasti so po aksonotmezi in zmrzovanju v distalnem krnu ohranjene cevke BL, ki aksonom zagotavljajo ugodno rastno podlago *(34, 37, 39)*. V odsotnosti SC, ki bazalno lamino nevrilemskih cevk v normalnem distalnem krnu tvorijo in obnavljajo *(7)*, bi ustavitev regeneracije lahko pripisali degeneraciji BL nevrilemskih cevk do take mere, da regenerirajoči se aksoni skoznje ne morejo več rasti. Znano je namreč, da se rast regenerirajočih se aksonov skozi denaturirane nevrilemske cevke, v katerih so beljakovine BL denaturirane, zelo upočasni *(37)*. Poleg komponent ekstracelularnega matriksa imajo lahko na rast aksonov ugoden vpliv tudi različni na ekstracelularni matriks vezani humoralni dejavniki, ki bi jih lahko izločale SC *(7, 97)*. Tudi na razpoložljivost teh dejavnikov regenerirajočim se aksonom lahko dolgotrajna odsotnost SC vpliva negativno.

Sklepamo torej lahko, da je velik pomen celične podpore, torej namnožitve SC v distalnem krnu poškodovanega perifernega živca v tem, da tvorijo in vzdržujejo ugodno rastno podlago za regenererirajoče se aksone oziroma preprečijo njihovo degeneracijo.

Razlogi za retrakcijo aksonov v tretji fazi

Domnevamo lahko, da je za retrakcijo aksonov v tretji fazi regeneracije skozi brezcelični distalni krn kriva bodisi degeneracija rastne podlage, na katero se adherirajo aksoni, bodisi daljše obdobje odsotnosti trofičnih dejavnikov, ki jih izločajo celice distalnega krna v nezmrzovanem živcu, lahko pa tudi kombinacija obojega.

Rezultati testa uščipa živca v poskusni skupini B, kjer so se aksoni regenerirali skozi brezcelični distalni krn po predhodnem kolateralnem brstenju, glede na dosedanje znanje bolj podpirajo drugo možnost. Ugotovili smo namreč, da po predhodnem kolateralnem brstenju, ki brsteče nevrone »založi« z rastnimi dejavniki, predvsem NGF (61), do retrakcije aksonov v drugem tednu po poškodbi ni prišlo, pa tudi do konca opazovanega obdobja šestih tednov po poškodbi retrakcije aksonov nismo opazili. Oddaljenost točk pozitivnega testa uščipa suralnega živca od mesta aksonotmeze se je po 14 dneh še nekoliko

povečala, nato pa se je ustalila. Tudi število aksonov 6 mm distalno od mesta aksonotmeze je ostalo visoko vseh 6 tednov po poškodbi. Med kolateralnim brstenjem se v denervirani koži povečata ekspresija NGF *(81)* in ekspresija receptorjev za NGF na senzoričnih aksonih *(61)*. Brstenje aksonov je intrinzično odvisno od NGF *(61, 86)*. Upravičeno domnevamo, da povečan priliv NGF pomembno vpliva na brsteče senzorične nevrone. Če bi bil ta učinek dolgotrajen (do 6 tednov), bi morda to razložilo, zakaj ti nevroni ne retrahirajo svojih aksonov. Domnevamo lahko, da daljše pomanjkanje NGF pri nevronih, ki niso predhodno brsteli, te nevrone prej privede do stanja, v katerem morajo retrahirati svoje aksone iz brezceličnega segmenta, kjer ni rastnih dejavnikov, kot brsteče aksone. Teoretično bi bilo možno, da je tudi za retrakcijo primarni vzrok degeneracija rastne podlage in to tistega dela podlage, ki so ga regenerirajoči se aksoni že prerasli. Adhezija na podlago bi lahko popustila, če bi propadla večina adhezijskih molekul v bazalnih laminah, aksoni bi se zato morali retrahirati. Vendar naše poznavanje literature ne daje nobene razlage, kako bi lahko predhodno brstenje v koži naredilo BL nevrilemskih cevk bolj odporno na naknadno degeneracijo v brezceličnem distalnem krnu, čeprav tega tudi izključiti ni mogoče. Zato domnevamo, da gre primarni učinek predhodnega kolateralnega brstenja prek telesa nevrona. Možno pa bi bilo, da gre za kombinacijo obeh mehanizmov in da so na napredujoče degenerativne spremembe podlage bolj občutljivi aksoni, ki nimajo trofične podpore SC (aksoni, ki se regenerirajo skozi brezcelični krn brez predhodnega kolateralnega brstenja). Predhodno brsteči aksoni so zaradi dolgotrajnega vpliva rastnih dejavnikov, katerih so bili v obdobju kolateralnega brstenja deležni v povečani količini, na neugodne spremembe rastne podlage bolj odporni, kar bi retrakcijo odložilo.

Aksoni v poškodovanih suralnih živcih skupine C, kjer smo ob aksonotmezi in zmrzovanju živca z mitomicinom dodatno zavrli proliferacijo SC v proksimalnem krnu, so se v tretji fazi regeneracije, torej fazi retrakcije, umaknili prav do mesta aksonotmeze. To lahko pripišemo skoraj popolni odsotnosti SC v distalnem krnu v celotnem opazovanem obdobju (mitomicin v takih pogojih zavre proliferacijo SC vsaj za 4 tedne, *(94)*) in posledično bolj izraženemu pomanjkanju trofičnih dejavnikov kot v skupini A, kjer so se od trenutka poškodbe naprej SC v proksimalnem krnu razmnoževale in migrirale v brezcelični distalni krn. Zdi se, da se v razmerah, ko rastna podlaga regenerirajočih se aksonov degenerira, rastnih dejavnikov v okolici aksonskih končičev pa dlje časa primanjkuje, prej rastoči aksoni retrahirajo prav do SC, ki so hkrati rastna podlaga in vir trofičnih dejavnikov. Opazili smo namreč, da so se v primeru, ko so se SC iz proksimalnega krna lahko razmnoževale in migrirale, aksoni 28 dni po poškodbi retrahirali na razdaljo približno 7 mm distalno od poškodbe (razdaljo, ki so jo iz proksimalnega krna migrirajoče SC v tem času verjetno že dosegle *(98)*). V poskusni skupini C, kjer 28 dni po poškodbi v distalnem krnu verjetno ni bilo SC, so se aksoni umaknili prav do mesta poškodbe. Za podkrepitev teh domnev bi bile potrebne nadaljnje morfološke raziskave.

Sklepamo torej lahko, da je pomen celične podpore regenerirajočim se aksonom v distalnem krnu poškodovanega živca najbrž trojen:

- razmnožene SC tvorijo in vzdržujejo ugodno rastno podlago za elongacijo in preprečitev retrakcije aksonov,
- rastni dejavniki iz SC omogočijo regenerirajočim se aksonom večjo odpornost na poslabšanje lastnosti rastne podlage,
- ob ohranjeni podlagi rastni dejavniki iz SC pospešijo elongacijo regenerirajočih se aksonov.

Problem razlike med aksonotmezo in nevrotmezo glede regeneracije skozi brezcelični krn

Podobnega opažanja o večfaznosti regeneracije senzoričnih aksonov v literaturi nismo zasledili. Vsi nam znani poskusi, v katerih so raziskovali učinek dolgotrajne odsotnosti celične podpore v distalnem krnu na regeneracijo, so namreč kot model poskusne poškodbe uporabili nevrotmezo, popolno prekinitev živca. Anderson in sodelavci so, ko so primerjali rast aksonov v celični in brezcelični presadek, opazili rast aksonov v brezcelični presadek šele

po 14 dneh, ko so aksoni v presadek rasli v spremstvu SC *(92)*, Nadim in sodelavci pa so ugotovili, da se po 14-dnevni začetni zamudi aksoni zelo počasi regenerirajo do 6. tedna po poškodbi, ko se regeneracija aksonov v brezcelični vsadek popolnoma ustavi *(99)*.

Razliko med rezultati v poskusih, v katerih so kot poskusno poškodbo uporabili aksonotmezo, in tistimi, v katerih so uporabili nevrotmezo, lahko razložimo s stališča, da se lastnosti rastne podlage s časom spreminjajo. Pri popolni prekinitvi živca in mikrokirurški repoziciji aksoni v brezcelični distalni krn vraščajo okoli 14 dni kasneje kot pri aksonotmezi *(92)*. To je verjetno posledica dolgotrajne rasti čez vrzel med krnoma (angl. *gap*), za katero so nujno potrebne vitalne SC *(94)*. Zato je rastna podlaga v distalnem krnu, ko jo regenerirajoči se aksoni dosežejo, že preveč spremenjena, da bi aksonom omogočala elongacijo. To razloži opažanje raziskovalcev, da v takih razmerah aksoni rastejo le v spremstvu SC *(92, 93, 99)*, pa še to zelo počasi in največ 20 mm daleč v distalni brezcelični krn *(99)*.

ZAKLJUČKI

1. S testom uščipa živca smo ugotovili, da se je začetna, razmeroma hitra rast (2,4 mm/dan) regenerirajočih se senzoričnih aksonov skozi brezcelični distalni krn suralnega živca po 8 dneh ustavila, nato pa so se vodilni aksoni do 28. dneva retrahirali z 18 na 7 mm od mesta aksonotmeze, število aksonov v distalnem krnu pa se je zmanjšalo. Kasneje se je rast aksonov zopet vzpostavila, a je bila zelo počasna.
2. Če je bilo z vbrizganjem mitomicina v proksimalni krn ob poškodbi živca preprečeno razmnoževanje in migracija SC, začetna regeneracija aksonov ni bila huje prizadeta. Po zastoju elongacije so se vodilni aksoni retrahirali prav do mesta aksonotmeze, v distalnem krnu pa histološko nismo več našli aksonov.
3. Če so senzorični aksoni pred aksonotmezo kolateralno brsteli v denervirano kožo in bili tako izpostavljeni obilici NGF, so v začetni fazi po aksonotmezi skozi distalni brezcelični odsek rasli hitreje, do zastoja rasti pa je prišlo kasneje kot pri tistih, ki predhodno niso brsteli. Do 6 tednov po poškodbi pri predhodno brstečih aksonih nismo opazili retrakcije, število aksonov v distalnem krnu je vseskozi ostalo visoko.
4. Rezultati podpirajo domnevo, da je pomen celične podpore v distalnem krnu predvsem v tem, da razmnožene SC vzdržujejo ugodno rastno podlago za regenerirajoče se aksone. Izpostavljenost rastnim dejavnikom iz SC verjetno poveča sposobnost aksonov, da rastejo ali obstanejo na slabši podlagi. Ob ohranjeni rastni podlagi v distalnem krnu rastni dejavniki pospešijo elongacijo regenerirajočih se aksonov.

ZAHVALA

Hvala profesorju Janezu Sketlju in Fajku Bajroviću, mojima učiteljema, za veliko več kot le mentorstvo.

LITERATURA

1. Lundborg G. Nerve regeneration problems in a clinical perspective. *Restor Neurol Neurosci 1990; 1:* 297–302.
2. Seddon HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves.* Baltimore MD: Williams and Wilkins; 1972. p. 267.
3. Waller AV. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produce thereby in the structure of the primitive fibres. *Phil TransR Soc Lond B Biol Sci, 1850; 140:* 423.
4. Friede RL, Bischausen R. The fine structure of transsected nerve fibres in subserial sections. *J Neurol Sci, 1980; 44:* 181–203.
5. Perry VH, Brown MC. Macrophages and nerve regeneration. *Curr Opin Neuro*, *1992; 2:* 697–682.
6. Clarke D, Richardson P. Peripheral nerve injury. *Curr Opin Neuro*, *1994; 7:* 415–21.
7. Salonen V, Aho H, Roytta M, Peltonen J. Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. *Acta Neuropathol (Berl)*, *1988; 75:* 331–6.
8. Beuche W, Friede RL. The role of nonresident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol, 1984; 13:* 767–96.
9. Heumann R, Korschnig S, Bandtlow C, Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transsection. *J Cell Biol, 1987; 104:* 1623–31.

10. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates nerve growth factor (NGF) synthesis in the non-neuronal cells of the rat sciatic nerve. *Nature, 1987; 330:* 658–9.
11. Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol, 1989; 15:* 513–29.
12. Golding JP, Zammit PS, Tonge DA. Effects of freezing a segment of peripheral nerve on subsequent protein release and axonal regeneration in the frog. *Exp Neurol, 1992; 118:* 178–86.
13. Miyamoto Y, Higaki T, Sugita T, Ikuta T, Tsuge K. Morphological reaction of cellular elements and the endoneurium following nerve section. *Peripher Nerve Repair Regener, 1986; 3:* 7–18.
14. Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur J Neurosci, 1989; 1:* 27–33.
15. Brown MC, Lunn ER, Perry VH. Consequences of slow Wallerian degeneration for regenerating motor and sensory axons. *J Neurobiol, 1991; 30:* 124–6.
16. Bedi KS, Winter J, Berry M, Cohen J. Adult dorsal root ganglion neurons extend neurites on predegenerated but not normal peripheral nerves in vitro. *Eur J Neurosci, 1992; 4:* 193–200.
17. Scherer SS, Easter SS. Degenerative and regenerative changes in the trochlear nerve in goldfish. *J Neurocytol, 1984; 13:* 519–65.
18. Rich KM, Disch SP, Eichler ME. The influence of regeneration and nerve growth factor on the neuronal cell body reaction to injury. *J Neurocytol, 1989; 18:* 569–76.
19. Lubinska L. Demyelination and remyelination in the proximal parts of regenerated nerve fibres. *J Comp Neurol, 1961; 117:* 275.
20. Morris JH, Hudson AR, Weddell G. A study of degeneration and regeneration in devided rat sciatic nerve based on electron microscopy. I. The traumatic degeneration of myelin in the proximal stump of the divided nerve. *Z Zellforsch, 1972; 124:* 76.
21. Holmquist B, Kanje M, Kerns JM, Danielsen N. A mathematical model for regeneration rate and initial delay following surgical repair of peripheral nerves. *J Neurosci Methods, 1993; 48:* 27–33.
22. Oderfeld Nowak B, Niemirko S. Synthesis of nucleic acids as the early cellular response to nerve injury. *J Neurochem, 1969; 16:* 235–48.
23. Friede RL, Johnstone MA. Reponses of thymidine labeling of nuclei in gray matter and following sciatic nerve transsection. *Acta Neuropathol, 1967; 7*: 218–31.
24. Liebermann AR. Some factors affecting retrograde neuronal responses to axonal lesions. *Essays on the nervous system*. Oxford: Clarendon press; 1974. p. 71–105.
25. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci, 1990; 13:* 43–60.
26. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of neural science*. New York: Elsevier; 1991. p. 260.
27. Jacobson RD, Virag I, Skene JHP. A protein associated with axon growth, GAP-43 is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci, 1986; 6:* 1843–55.
28. Skene JHP. Axonal growth associated proteins. *Annu Rev Neurosci, 1989; 12:* 127–56.
29. Purves D, Nja A. Effect of nerve growth afctor on synaptic depression after axotomy. *Nature, 1976; 260:* 535–6.
30. Anderson PN, Turmaine M. Peripheral nerve regeneration through grafts of living and freeze-dried CNS tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol, 1986; 12:* 389–99.
31. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into the peripheral nervous system »bridges« after central nervous system injury in adult rats. *Science, 1982; 214:* 931–3.
32. Ramon y Cajal S. *Degeneration and regeneration of the nervous system.* London: Hafner; 1986 (Facsimile of the 1928 edition). p. 265–80.
33. Raivich G, Kreutzberg G. Peripheral nerve regeneration: Role of growth factors and their receptors. *Int J Dev Neurosci, 1993; 11:* 311–24.
34. Ide C, Tohayama K, Yokota R, Nitatori T, Onodera S. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res, 1983; 288:* 61–75.
35. Ide C, Osawa T, Tohyama K. Nerve regeneration through allogenic nerve grafts with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. *Prog Neurobiol 1990; 34:* 1–38.
36. Bunge Bartlett M, Bunge RP, Kleitman N, Dean AC. Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and neurite regeneration. *Dev Neurosci, 1989; 11:* 348–60.
37. Sketelj J, Bresjanac M, Popović M. Rapid growth of regenerating axons across segments of sciatic nerve devoid of Schwann cells. *J Neurosci Res, 1989; 24:* 153–62.
38. Wang GY, Hirai KI, Shimada H. The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within antiserum treated nerve grafts. *Brain Res, 1992; 570:* 116–25.
39. Wang GY, Hirai KI, Shimada H, Taji S, Zhong SZ. Behavior of axons, Schwann cells and perineural cells in nerve regeneration within transplanted nerve grafts: effects of anti – laminin and anti – fibronectin antisera. *Brain Res, 1992; 583:* 216–26.
40. Reichard LF, Bixby JL, Hall DE, Ignatius MJ, Neugebauer KM, Thomaselli KJ. Integrins and cell adhesion molecules: neuronal receptors that regulate axon growth on extracellular matrices and cell surfaces. *Dev Neurosci, 1989; 11:* 332–47.

41. Letourneau PC. Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. *Dev Biol, 1978; 66:* 183–96.
42. Tomaselli KJ, Reichardt LF, Bixby JL. Distinct molecular interactions mediate neuronal process outgrowth on non-neuronal cell surfaces and extracellular matrices. *J Cell Biol, 1986; 103:* 2659–72.
43. Gundersen RW. Response of sensory neurites and growth cone to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. *Dev Biol*, *1987; 121:* 423–31.
44. Kerkhoff H, Jannekens FGI: Peripheral nerve lesions: The neuropharmacological outlook. *Clin Neurol Neurosurg*, *1993; 95 (Suppl):* S103–S108.
45. Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embrio. *J Exp Zool*, *1951; 116:* 321–61.
46. Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect, 1966*: 217–59.
47. Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiol Rev*, *1968; 48:* 534–69.
48. Thoenen H, Barde Y. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev*, *1980; 60:*1284–335.
49. Johnson EM, Rich KM, Yip HK. The role of NGF in sensory neurons in vivo. *Trends Neurosci*, *1986; 9:* 33–37.
50. Lindsay RM. Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal elongation but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci*, *1988; 8:* 2394–405.
51. Heumann R, Korschnig S, Scott J, Thoenen H. Relationship between the levels of nerve growth factor and its messanger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. *Eur Molec Biol Org J*, *1984; 3:* 3183–9.
52. Korschnig B, Thoenen H. Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation. *Proc Natl Acad Sci USA*, *1983; 80:* 3513–6.
53. Korschnig B, Thoenen H. Quantitative demonstration of retrograde transport of endogenous nerve growth factor. *Neurosci Lett*, *1983; 39:* 1–4.
54. Shelton DL, Reichardt LF. Expression of nerve growth factor gene correlates with density of sympathetic innervation in effector organs. *Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81:* 7951–5.
55. Richardson PM, Riopelle RJ. Uptake of nerve growth factor along peripheral and spinal axons of primary sensory neurons. *J Neurosci*, *1984; 7:* 1683–9.
56. Raivich G, Hellweg R, Kreutzberg GW. NGF receptor-mediated reduction in axonal NGF uptake and retrograde transport folloving sciatic nerve injury and during regeneration. *Neuron*, *1991; 7:* 1–20.
57. Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Goetz R, Barde Y. Binding of neurotrophin-3 to neuronal receptors and interactions with the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *Eur Molec Biol Org J, 1992; 11:* 917–22.
58. Verge VMK, Riopelle RJ, Richardson PM. Nerve growth factor receptors on normal and injured sensory neurons. *J Neurosci*, *1989; 9:* 914–22.
59. Rich KM, Disch SP, Eichler ME. The influence of regeneration and nerve growth factor on the neuronal cell body reaction to injury. *Exp Neurol*, *1989; 105:* 162–70.
60. Rich KM, Alexander TD, Pryor JC, Hollowel JP. Nerve growth factor enhances regeneration through silicone chambers. *Exp Neurol*, *1989; 105:* 162–170.
61. Diamond J, Coughlin M, MacIntyre L, Holmes M, Visheau B. Evidence that endogenous nerve growth factor is responsible for collateral sprouting, but not the regeneration of nociceptive axons in adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, *1987; 84:* 6596–600.
62. Wright EM, Vogel KS, Davies AM. Neurotrophic factors promote the maturation of developing sensory neurons before they become dependent on these factors for survival. *Neuron*, *1992; 9:* 139–50.
63. Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol*, *1992; 119:* 45–54.
64. Tetzlaff W, Leonard CA, Harrington KC. Expression of neurotrophin receptor mRNAs in axotomised facial and rubrospinal neurons. *Soc Neurosci Abstr*, *1992; 18:* 546.
65. Kelin R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M. TrkB, a novel tyrosine kinase receptor expressed during mouse neural development. *Eur Molec Biol Org J*, *1989; 8:* 3701–9.
66. Sara VR, Hall K, Mizaki M, Fryklund L, Christensen N, Wettenberg L. Ontogenesis of somatomedin and insuli receptors in the human fetus. *J Clin Invest*, *1983; 71:* 1084–94.
67. Kanje M, Skottner A, Sjoeberg J, Lundborg G. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res*, *1989; 486:* 396–8.
68. Sjoeberg J, Kanje M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) as a stimulator of regeneration in freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res*, *1989; 485:* 102–8.
69. Curtis R, Scherer SS, Somogyi R, Adryan KM, Ip NY, Zhu Y, Lindsay RM, DiStefano PS. Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron, 1994; 12:* 191–204.
70. Pollock LJ. Nerve overlap as related to the relatively early return of pain sense following injury to the peripheral nerves. *J Comp Neurol 1920; 32:* 357.

71. Weddell G, Guttmann L, Guttmann E. The local extension of nerve fibers into denervated areas of skin. *J Neurol Psych 1941; 4:* 206–25.
72. Devor M, Schonfeld D, Seltzer Z, Wall PD. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol 1979; 185:* 221–20.
73. Fitzgerald M, Woolf CL, Shortland P. Collateral sprouting of the central terminals of cutaneous primary afferent neurons in the rat spinal cord: pattern, morphology, and influence of targets. *J Comp Neurol 1990; 300:* 370–85.
74. Bajrović F, Sketelj J. Collateral sprouting of cutaneous sensory afferents. *Zdrav Vestn*, *1996; 65:* 543–7.
75. Kennedy WR, Sakuta M. Collateral reinnervation of sweat glands. *Ann Neurol 1984; 15:* 73–8.
76. Crutcher KA, Brothers L, Davis JN. Sympathetic noradrenergic sprouting in response to central cholinergic denervation: A histochemical study of neuronal sprouting in the rat hippocampal formation. *Brain Res 1981; 210:* 115–28.
77. Duchen LW, Strich SJ. The effects of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle in the mouse. *Q J Exp 1968; 53:* 84–9.
78. Brown MC, Holland RL, Ironton R. Nodal and terminal sprouting from motor nerves in fast and slow muscles of the mouse. *J Physiol 1980; 306:* 493–511.
79. Olsen L, Malmfors T. Growth characteristics of adrenergic nerves in the adult rat. Fluorescence, histochemical and 3H-noradrenaline uptake studies using tissue transplanted to the anterior chamber of the eye. *Acta Physiol Scand 1970; 348 Suppl:* 1–111.
80. Stoeckel K, Schwab ME, Thoenen H. Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study. *Brain Res 1975; 89:* 1–14.
81. Mearow KM, Kril Y, Diamond J. Increased NGF mRNA expression in denervated rat skin. *NeuroReport 1993; 4:* 351–4.
82. Tron VA, Coughlin MD, Jang DE, Stanisz J, Sauder DN. Expression and modulation of nerve growth factor in murine keratinocytes (PAM 212). *J Clin Invest 1990; 85:* 1085–9.
83. Acheson A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: Inhibiton by antibodies to NGF. *Neuron 1991; 7:* 265–75.
84. Shelton DL, Reichardt LF. Studies on β-nerve growth factor gene expression in the rat iris: the level of mRNA-encoding nerve growth factor is increased in irises placed in explant cultures in vitro, but not in irises deprived of sensory or sympathetic innervation in vivo. *J Cell Biol 1986; 102:* 1940–8.
85. Gloster A, Diamond J. Symphatetic nerves in adult rats regenerate normally and restore pilomotor function during an anti-NGF treatment that prevents their collateral sprouting. *J Comp Neurol 1992; 326:* 363–74.
86. Diamond J, Holmes M, Coughlin M. Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. *J Neurosci 1992; 12:* 1454–66.
87. Mearow KM, Krill Y, Gloster A, Dimond J. Expression of NGF receptor and GAP-43 mRNA in DRG neurons during collateral sprouting and regeneration of dorsal cutaneous nerves. *J Neurobiol 1994; 25:* 127–42.
88. Remškar M. Vpliv predhodnega kolateralnega brstenja aksonov na hitrost njihove regeneracije po poškodbi. *Raziskovalna naloga po razpisu za Prešernove nagrade študentom za leto 1995.*
89. Sketelj J, Bajrović F. Nerve regeneration and collateral sprouting. *9th European Congress of clinical neurology (Proceedings)*, *1998:* 29–32.
90. Bresjanac M, Sketelj J. Neurite – promoting influences of proliferating Schwann cells and target tissues are not prerequisite for rapid axonal elongation after nerve crush. *J Neurosci Res, 1989; 24:* 501–7.
91. Bajrović F, Bresjanac M, Sketelj J. Long – term effects of deprivation of cell support in distal stump on peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Res, 1989; 39*: 23–30.
92. Anderson PN, Mitchell J, Mayor D, Stauber VV. An ultrastructural study of the early stages of axonal regeneration through rat nerve grafts. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *1983; 9:* 455–466.
93. Hall SM. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol; 1986; 12:* 27–46.
94. Hall SM. The effect of inhibiting Schwann cell mitosis on the reinnervation of acellular autografts in the peripheral nervous system of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *1986; 12:* 401–14.
95. Young JZ, Medwar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. Measurement of the rate of elongation. *Lancet II, 1940;* 126–8.
96. Glantz SA, Slinker BK. *Primer of applied regression and analysis of variance*. New York: McGraw-Hill; 1990.
97. Labrador RO, Buti M, Navaro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol, 1998; 141 (1):* 243–52.
98. Bresjanac M, Popović M. In vivo study of regeneration of Schwann cell-deprived axons and migration of denervated Schwann cells. *9th European Congress of clinical neurology (Proceedings)*, *1998:* 39–43.
99. Nadim W, Anderson PN, Turmaine M. The role of Schwann cells and basal lamina tubes in the regeneration through long lenghts of freeze – killed nerve grafts. *Neuropathol Appl Neurobiol, 1990*; *16:* 411–421.

Prispelo 10. 9. 1999